

Ю.С. ВИННИК, Р.А. ПАХОМОВА, Л.В. КОЧЕТОВА,
Г.Э. КАРАПЕТЯН



ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Красноярский государственный медицинский университет
им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск,
Российская Федерация

Цель. Изучить химический состав и морфологию эритроцита у пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести.

Материал и методы. Электронная микроскопия эритроцитов выполнена на сканирующем электронном микроскопе Hitachi 5500 (Япония), спектральный анализ состава эритроцитов периферической крови рассчитан с помощью программы QUANTAX 70 у 17 пациентов с механической желтухой доброкачественного генеза тяжелой степени тяжести и 14 условно здоровых лиц. Степень тяжести механической желтухи определяли по Э.И. Гальперину (2012). В исследование включены пациенты с механической желтухой тяжелой степени тяжести, клиническими признаками эндотоксикоза и печеночно-клеточной недостаточности. Уровень билирубина у исследуемых пациентов был выше 180 мкмоль/л, уровень аланиновой и аспарагиновой трансаминаз в 2-3 раза превышал норму.

Результаты. У пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести изменялся цитоскелет эритроцита: из двояковогнутого сфероцита он превращался в куполообразный стоматоцит. Концентрация кислорода в клетке достоверно уменьшалась и достигала минимальных значений, 14,9%. Внутри клетки нарастала гипокалиемия, увеличивалось содержание натрия до 7,1% и ионов кальция до 2,9%, что «утяжеляло» клетку, задерживая в ней воду и, по всей видимости, приводило к изменению формы эритроцита и его функциональных возможностей. Значимых изменений в концентрации углерода и азота внутри клетки не выявлено.

Заключение. У пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести с выраженными явлениями эндогенной интоксикации запускается каскад биохимических реакций. Увеличение содержания внутри клетки химических элементов, удерживающих воду, по всей видимости, приводит к изменению морфологии эритроцита, его молекулярной структуры и функциональных возможностей. Изменение цитоскелета эритроцита нарушает его кислородтранспортную функцию, а снижение содержания кислорода в клетке усугубляет тканевую гипоксию.

Ключевые слова: механическая желтуха, интоксикация, электронная микроскопия эритроцита, химические элементы, кислородтранспортная функция эритроцита

Objective. To study chemical composition and morphology of an erythrocyte in patients with severe obstructive jaundice.

Methods. Erythrocyte electron microscopy was performed on Hitachi 5500 scanning electron microscope (Japan), the spectral analysis of the peripheral blood erythrocyte composition was calculated using the QUANTAX 70 program in 17 patients with the severe obstructive jaundice and 14 conditionally healthy individuals. The severity of obstructive jaundice was determined by E.I. Halperin (2012). The study included the patients with severe obstructive jaundice, with clinical signs of endotoxemia and hepatic cell failure. The level of bilirubin in the studied patients was higher than 180 mol / L, the level of alanine and aspartic transaminases was 2-3 times higher than normal.

Results. In patients with severe obstructive jaundice, the erythrocyte cytoskeleton changed: from a biconcave spherocyte, it turned into a domed stomatocyte. The oxygen concentration in the cell significantly decreased and reached its minimum value, 14.9%. Hypokalemia increased inside the cell, the content of sodium increased to 7.1% and calcium ions to 2.9%, which “made the cell heavier”, retaining water in it and, most likely, led to a change in the shape of the red blood cell and its functional capabilities. Significant changes in the concentration of carbon and nitrogen inside the cell were not detected.

Conclusions. In patients with severe obstructive jaundice with marked phenomena of endogenous intoxication, a cascade of biochemical reactions is launched. An increase in the content of chemical elements inside the cell holding water, apparently, leads to a change in the morphology of the red blood cell, its molecular structure and functional capabilities. A change in the erythrocyte cytoskeleton disrupts its oxygen transport function, and a decrease in the oxygen content in the cell exacerbates tissue hypoxia.

Keywords: obstructive jaundice, intoxication, electron microscopy of a red blood cell, chemical elements, oxygen-transport function of a red blood cell

**Научная новизна статьи**

Впервые при исследовании эритроцитов пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TH-5500 (Япония) доказано, что при тяжелой степени тяжести механической желтухи эритроцит из двояковогнутого сфероцита трансформируется в куполообразный стоматоцит, концентрация кислорода и калия в клетке значительно уменьшается, а содержание натрия и кальция больше, чем у здоровых людей.

What this paper adds

For the first time at the research of erythrocytes in patients with severe obstructive jaundice on the scanning electronic microscope Hitachi TH-5500 (Japan) it has been proved that in case of severe obstructive jaundice, the erythrocyte from the biconcave spherocyte is transformed to dome-shaped stomatocyte; concentration of oxygen and potassium in the cell significantly decreases, and the content of sodium and calcium is higher than at healthy people.

Введение

Растущая заболеваемость желчнокаменной болезнью, стабильные показатели осложненного течения заболевания, в том числе механической желтухой (МЖ) вследствие холангиолитиаза, синдрома Мирizzi и ятрогений, оставляют проблему лечения пациентов с механической желтухой, осложненной печеночной недостаточностью, в ряду актуальных. На фоне МЖ хирургические вмешательства зачастую носят нерадикальный характер, процент осложнений остается высоким, послеоперационная летальность у больных механической желтухой, осложненной эндогенной интоксикацией и прогрессирующей печеночной недостаточностью, достигает 20-60% [1]. Кроме того, только декомпрессия желчных протоков не позволяет стабилизировать функциональное состояние печени, и в послеоперационном периоде явления печеночно-клеточной недостаточности продолжают нарастать [2, 3].

В связи с отсутствием эффективных средств медикаментозной коррекции печеночной недостаточности и серьезностью прогноза осложнений, характеризующихся высокой летальностью, одним из путей улучшения показателей лечения пациентов с нарушением проходимости желчных протоков является поиск надежных методов прогнозирования и профилактики печеночной недостаточности [2, 4].

Эритроциты являются доступным биологическим объектом, тонко реагирующим на различные системные нарушения в организме. Мембранам эритроцита свойственны общие закономерности организации биологических мембран, поэтому их можно использовать как модель для выявления общих структурно-функциональных характеристик мембран и их изменений при различных патологических состояниях. В отношении эритроцитов доказано изменение его формы и структуры мембран при различных системных патологических процессах в организме [5, 6, 7, 8].

Цель. Изучить химический состав и морфологию эритроцита у пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести.

Материал и методы

Обследовано 17 пациентов с механической желтухой доброкачественного генеза с тяжелой степенью тяжести по критериям Э.И. Гальперина (2012 г.). У всех обследованных пациентов на фоне МЖ (механической желтухи) определялись клинические признаки эндотоксикоза и печеночно-клеточной недостаточности, уровень билирубина превышал 180 мкмоль/л, уровень аланиновой и аспарагиновой трансаминаз был в 2-3 раза выше нормы. В качестве контрольной группы обследовано 14 условно здоровых людей, в анамнезе которых не было заболеваний желчевыводящих путей. Все пациенты и условно здоровые люди дали письменное добровольное информированное согласие на участие в клиническом исследовании. Группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Забор крови осуществляли из кубитальной вены при поступлении пациента. Микроскопию эритроцитов выполняли на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TH-5500 (Япония), оценку спектрального состава эритроцитов периферической крови выполняли с помощью программы QUANTAX 70 в Институте физики им. Л.В. Киренского СО РАН, г. Красноярск. На мембране эритроцита определяли содержание ионов калия, натрия, алюминия, кальция, хлора, железа, меди, стронция и содержание кислорода.

Статистика

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ Statistica for Windows 6.0, SPSS 10.0.5 FOR Windows. Характер распределения изучаемых признаков определялся при помощи критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде медианы

и квартилей. Статистическую значимость различий между показателями оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. В результате статистически значимым уровнем различий при сравнении групп считали $p < 0,05$.

Результаты

Эритроциты практически здоровых людей при электронной микроскопии имели форму двояковогнутого сфероцита с выраженной, отчетливо контурированной мембраной и однородной цитоплазмой (рис. 1). При спектроскопии по кислороду эритроциты имели достаточно высокое содержание кислорода (рис. 2).

У пациентов с тяжелой степенью тяжести МЖ при электронной микроскопии выявлено, что эритроцит из двояковогнутого трансформировался в куполообразную клетку – стоматоцит (рис. 3).

При спектроскопии по кислороду у данной группы пациентов отмечено увеличение количества клеток куполообразной формы с

неструктурированной мембраной и низким содержанием кислорода (рис. 4).

Внутриклеточно определяли наиболее значимые химические элементы: кислород, калий, натрий, кальций и азот (таблица).

При расшифровке химического состава эритроцитов у пациентов при высокой билирубинемии отмечено изменение содержания всех исследуемых химических элементов. Концентрация кислорода в клетке при эндогенной интоксикации была меньше, чем в контрольной группе, и достигала значений 14,90% [13,20; 15,60] ($p=0,001$).

Концентрация натрия внутри клетки была значимо выше, чем у здоровых людей, и составила 7,10% [6,70; 7,50] ($p=0,001$). Гипокалиемия внутри клетки прогрессивно нарастала. При нарастании интоксикации в клетке увеличивалось содержание кальция. У пациентов с тяжелой степенью тяжести МЖ содержание кальция было в 1,5 раза больше нормы – 2,40% [2,30; 2,60] ($p=0,001$). Значимых изменений в концентрации углерода и азота не выявлено.

Рис. 1. Электронная микроскопия эритроцита практически здорового человека.



Рис. 2. Трехмерное спектральное изображение эритроцита периферической крови практически здорового человека.

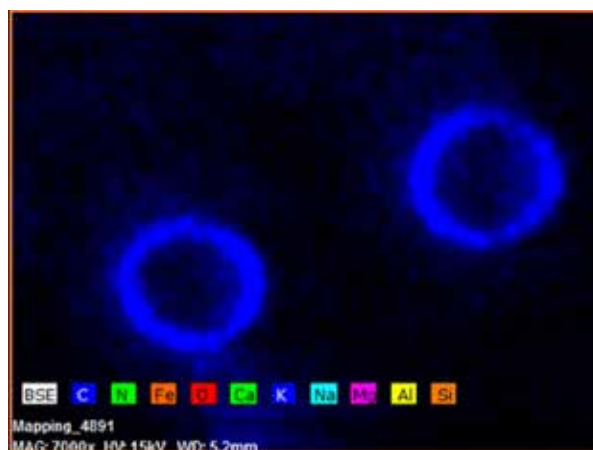


Рис. 3. Электронная микроскопия эритроцитов пациентов с тяжелой степенью тяжести механической желтухи.

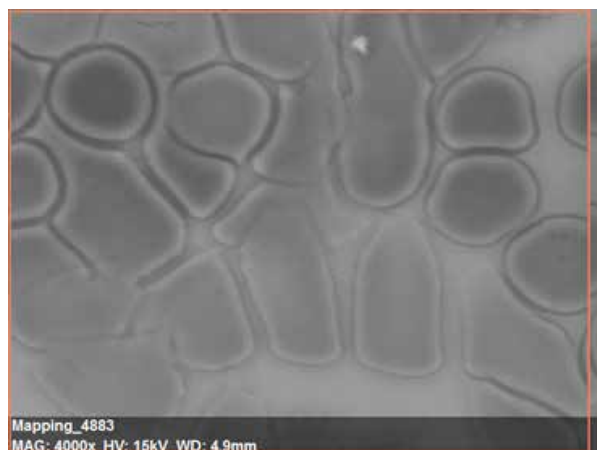
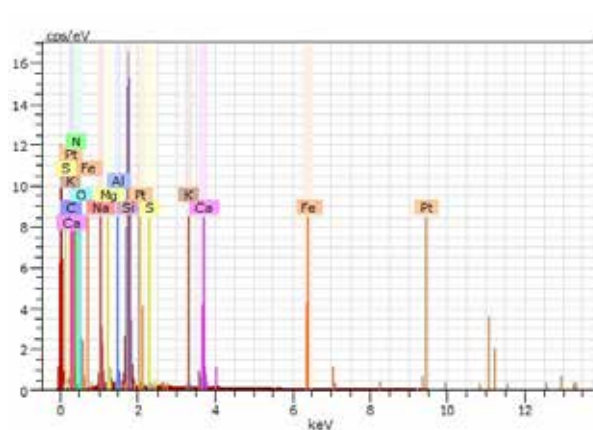


Рис. 4. Электронная микроскопия эритроцитов периферической крови пациентов с механической желтухой.



Таблица

**Химический состав эритроцита периферической крови
у пациентов исследуемых групп (Ме (25%; 75%))**

Показатель	Контрольная группа	Пациенты с механической желтухой
Натрий (%)	4,20 [4,00; 4,40]	7,10 [6,70; 7,50] p=0,001
Калий (%)	0,30 [0,24; 0,32]	0,13 [0,12; 0,14] p=0,001
Кальций (%)	1,40 [1,10; 1,60]	2,40 [2,30; 2,60] p=0,001
Кислород (%)	20,30 [19,80; 21,50]	14,90 [13,20; 15,60] p=0,001
Углерод (%)	65,00 [60,50; 66,70]	62,40 [60,70; 67,30] p=0,667
Азот (%)	8,50 [7,80; 8,90]	7,10 [3,20; 8,30] p=0,569

Примечание: p — достоверность различий между исследуемыми показателями пациентов с механической желтухой и здоровых людей.

Таким образом, у пациентов с МЖ тяжелой степени тяжести изменяется форма клетки, ее мембрана и внутриклеточный состав ионов, обеспечивающих функциональное состояние клетки.

Обсуждение

При сравнительной электронной микроскопии получены убедительные доказательства влияния степени билирубинемии на форму и структурное строение мембраны эритроцита, что согласуется с данными, полученными при атомно-силовой микроскопии эритроцита человека и животного при разной степени билирубинемии. Изменение цитоскелета эритроцита описан у больных сахарным диабетом, красной волчанкой, бронхиальной астмой. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза многие исследователи расценивают как типовую реакцию данного организма на патологический процесс [5, 6, 8].

При электронном спектральном анализе ионного состава эритроцита у пациентов с МЖ тяжелой степени тяжести выявлено достоверное снижение в клетке уровня кислорода и калия и повышение уровня натрия и кальция. По всей видимости, увеличение количества ионов натрия и кальция внутри клетки «утяжеляет» ее и задерживает воду, что, в свою очередь, вызывает изменение формы эритроцита, превращая его из двояковогнутого сфероцита в куполообразный стоматоцит. Кроме того, повышение концентрации внутриклеточного кальция является внутриклеточным специфическим стимулом, активирующим процесс гибели клеток.

Снижение содержания кислорода в эритроците вызывает тканевую гипоксию, что на фоне эндотоксикоза способствует переходу

физиологического апоптоза в патологический с последующей гибелью клетки.

Таким образом, интоксикация запускает каскад биохимических реакций, протекающих во всех клетках организма, наглядным проявлением которого становится изменение морфологии эритроцита, его молекулярной структуры и функциональных особенностей.

Выводы

1. У пациентов с механической желтухой тяжелой степени тяжести с выраженными явлениями эндогенной интоксикации в организме запускается каскад биохимических реакций, изменяющий морфологию эритроцита, его молекулярную структуру и функциональные возможности.

2. Изменение морфологии эритроцита на фоне нарастания эндогенной интоксикации на высоте билирубинемии вызвано дисбалансом катион-транспортующих систем, нарушением структуры и целостности мембраны клетки и низким уровнем клеточного метаболизма на фоне клеточной гипоксии.

Финансирование

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Авторы гарантируют, что они не получали никаких вознаграждений ни в какой форме от фирм-производителей лекарственных препаратов, медицинского оборудования и материалов, в том числе конкурентов, способных оказать влияние на результаты работы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, протокол 75/2016 от 16 марта 2017 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мамошин АВ, Альянов АЛ, Борсуков АВ. Малоинвазивные технологии в лечении больных с синдромом механической желтухи. *Ученые Зап Орлов Гос Ун-та*. 2013;(6):228-231. <http://oreluniver.ru/public/file/archive/201306.pdf>
2. Вишневецкий ВА, Ефанов МГ, Икрамов РЗ, Варава АВ, Трифонов СА. Современная хирургическая тактика при рубцовых стриктурах желчных протоков, тенденции и нерешенные вопросы. *Анналы Хирург Гепатологии*. 2017;22(3):11-18. <https://doi.org/10.16931/1995-5464.2017311-18>
3. Гальперин ЭИ, Моцунова ОН. Классификация тяжести механической желтухи. *Хирургия Журн им НИ Пирогова*. 2014;1:5-9. <https://www.mediasphera.ru/issues/khirurgiya-zhurnal-im-n-i-pirogova/2014/1>
4. Garcea G, Ngu W, Neal CP, Dennison AR, Berry DP. Bilirubin levels predict malignancy in patients with obstructive jaundice. *HPB (Oxford)*. 2011 Jun;13(6):426-30. doi: 10.1111/j.1477-2574.2011.00312.x
5. Braet F, Taatjes DJ, Wisse E. Probing the unseen structure and function of liver cells through atomic force microscopy. *J Nanosci Nanotechno*. 2018;73:3-30. doi: 10.1016/j.semcd.2017.07.001
6. Пахомова РА, Винник ЮС, Кочетова ЛВ, Воронова ЕА, Нагорнов ЮС. Атомно-силовая микроскопия эритроцита при разной степени тяжести механической желтухи (экспериментальное исследование). *Анналы Хирург Гепатологии*. 2017;22(1):82-87. <https://doi.org/10.16931/1995-5464.2017182-87>
7. Papakostas C, Bezirtoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopoulos C. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med*. 2003 Sep;3(2):124-28. doi: 10.1007/s10238-003-0015-y

Адрес для корреспонденции

660022, Российская Федерация,
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1,
Красноярский государственный
медицинский университет
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России,
кафедра общей хирургии,
e-mail: yuvinnik@yandex.ru,
Винник Юрий Семенович

Сведения об авторах

Винник Юрий Семенович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. профессора

8. Скоркина МЮ, Чернявских СД, Федорова МЗ, Забияков НА, Сладкова ЕА. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии. *Бюл Эксперим Биологии и Медицины*. 2010;150(8):238-40.

REFERENCES

1. Mamoshin AV, Alyanov AL, Borsukov AV. Mini-invasive technologies in the treatment of patients with the syndrome of obstructive jaundice. *Uchenye Zap Orlov Gos Un-ta*. 2013;(6):228-231. <http://oreluniver.ru/public/file/archive/201306.pdf> (In Russ.)
2. Vishnevsky VA, Efanov MG, Ikramov RZ, Varava AB, Trifonov SA. Modern surgical tactics for benign biliary strictures. trends and unresolved issues. *Annaly khirurgicheskoy Gepatologii = Annals of HPB Surgery*. 2017;22(3):11-18. <https://doi.org/10.16931/1995-5464.2017311-18> (In Russ.)
3. Galperin EI, Momunova ON. The classification of obstructive jaundice severity. *Khirurgiya Zhurn im NI Pirogova*. 2014;1:5-9. <https://www.mediasphera.ru/issues/khirurgiya-zhurnal-im-n-i-pirogova/2014/1> (In Russ.)
4. Garcea G, Ngu W, Neal CP, Dennison AR, Berry DP. Bilirubin levels predict malignancy in patients with obstructive jaundice. *HPB (Oxford)*. 2011 Jun;13(6):426-30. doi: 10.1111/j.1477-2574.2011.00312.x
5. Braet F, Taatjes DJ, Wisse E. Probing the unseen structure and function of liver cells through atomic force microscopy. *J Nanosci Nanotechno*. 2018;73:3-30. doi: 10.1016/j.semcd.2017.07.001
6. Pakhomova RA, Vinnik YS, Kochetova LV, Voronova EA, Nagornov YS. Atomic force microscopy of the erythrocyte in various severity of obstructive jaundice (experimental study). *Annaly Khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB Surgery*. 2017;22(1):82-87. <https://doi.org/10.16931/1995-5464.2017182-87> (In Russ.)
7. Papakostas C, Bezirtoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopoulos C. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med*. 2003 Sep;3(2):124-28. doi: 10.1007/s10238-003-0015-y
8. Skorkina Mlu, Cherniavskikh SD, Fedorova MZ, Zabiniaikov NA, Sladkova EA. Metodika otsenki morfometricheskikh parametrov nativnykh kletok krovi s ispol'zovaniem atomno-silovoi mikroskopii. *Biul Eksperim Biologii i Meditsiny*. 2010;150(8):238-40. (In Russ.)

Address for correspondence

660022, The Russian Federation,
Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak Str., 1,
Krasnoyarsk State Medical University
Named after Prof. V.F. Voino-Yasenetski,
Department of General Surgery.
e-mail: yuvinnik@yandex.ru,
Yurii S. Vinnik

Information about the authors

Vinnik Yurii S., MD, Professor, Head of the Department of General Surgery named after Prof. Gulman,

М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-8995-2862>

Пахомова Регина Александровна, д.м.н., ассистент кафедры общей хирургии им. профессора М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-3681-4685>

Кочетова Людмила Викторовна, к.м.н., профессор кафедры общей хирургии им. профессора М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0001-5784-7067>

Карапетян Георгий Эдуардович, д.м.н., профессор кафедры общей хирургии им. профессора М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-1216-2029>

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetski, Krasnoyarsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-8995-2862>

Pakhomova Regina A., MD, Assistant of the Department of General Surgery named after Prof. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetski, Krasnoyarsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-3681-4685>

Kochetova Lyudmila V., PhD, Professor of the Department of General Surgery named after Prof. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetski, Krasnoyarsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0001-5784-7067>

Karapetyan Georgii E., MD, Professor of the Department of General Surgery named after Prof. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetski, Krasnoyarsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-1216-2029>

Информация о статье

Получена 10 апреля 2019 г.

Принята в печать 2 декабря 2019 г.

Доступна на сайте 31 декабря 2019 г.

Article history

Arrived: 10 April 2019

Accepted for publication: 02 December 2019

Available online: 31 December 2019